

PCT
 ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



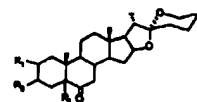
(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C07J 71/00, A01N 45/00	A1	(11) Número de publicación internacional: WO 97/13780 (43) Fecha de publicación internacional: 17 de Abril de 1997 (17.04.97)
(21) Solicitud internacional: PCT/CU96/00002 (22) Fecha de la presentación internacional: 11 de Octubre de 1996 (11.10.96) (30) Datos relativos a la prioridad: 92/95 12 de Octubre de 1995 CU (12.10.95)		(81) Estados designados: BR, MX, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i>
(71)(72) Solicitantes e Inventores: COLL MANCHADO, Francisco [CU/CU]; Calle 112 No. 515, Playa, Ciudad Habana 11400 (CU). JOMARRON RODILES, Isabel María [CU/CU]; Edificio 64 Apartamento 12 Zona 9, Alamar, Ciudad Habana 11700 (CU). ROBAINA RODRIGUEZ, Caridad Marcelina [CU/CU]; Perla entre 100 y Finca, Altahabana, Ciudad Habana 10400 (CU). ALONSO BECERRA, Esther María [CU/CU]; Calle F No. 558 entre 23 y 25, Plaza, Ciudad Habana 10400 (CU). CABRERA PEDROSO, María Teresa [CU/CU]; Avenida 17 No. 3621 Apartamento 3, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU). (74) Representante común: CABRERA PEDROSO, María Teresa; Facultad de Química, Zanja entre G y Mazón, Plaza, Ciudad Habana 10400 (CU).		

(54) Title: POLYHYDROXYSPIROSTANNONES AS PLANT GROWTH REGULATORS

(54) Título: POLIHIDROXIESPIROSTANONAS COMO REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

(57) Abstract

The present invention relates to the biochemistry field, and in particular to the production of new spirostannic analogs of brasinoesteroids with oxygenated functions at different positions of the ring A from steroidal sapogenines, through dihydroxylation reactions of a Δ^2 -steroid, as main reaction. The invention relates to the production of spirobrasino-steroids 6-oxo with oxygenated functions in positions 2 and 3 or 3 and 5, and having the general formula (2). These synthesized compounds have a regulating activity in plant growth, when applied in very low concentrations, with promising prospect in agriculture.



(57) Resumen

La presente invención se relaciona con la rama químico biológica, y en particular con la obtención de nuevos análogos espiroestánicos de brasinoesteroides con funciones oxigenadas en diferentes posiciones del anillo A a partir de sapogeninas esteroidales, mediante la realización de reacciones de dihidroxilación a un Δ^2 -esteroide, como reacción principal. Se describe la obtención de espirobrasino-esteroides 6-oxo con funciones oxigenadas en las posiciones 2 y 3 ó 3 y 5, con la fórmula general (2). Estos compuestos sintetizados presentan actividad reguladora del crecimiento vegetal en muy bajas concentraciones, con amplias perspectivas para su uso en la Agricultura.

COMPOUND Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
2a	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H α
2b	HO β	CH ₃ COO β	H α
2c	CH ₃ COO β	HO β	H α
2d	HO β	HO β	H α
2e	HO β	HO β	H β
2f	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H β
2g	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H α
2h	CH ₃ COO β	HO α	H α
2i	HO β	HO α	H α
2j	HO β	HO α	H β
2k	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H β
2l	CH ₃ COO α	CH ₃ COO β	H α
COMPOUND Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
2m	HO α	HO β	H α
2n	HO α	HO α	H α
2o	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	H α
2p	H	CH ₃ COO β	HO α
2q	H	HO β	HO α
2r	H	HO β	HO β
2s	HO α	HO α	HO α
2t	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	HO α

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungría	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelandia
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benin	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumania
BY	Belarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular	SD	Sudán
CF	República Centroafricana		Democrática de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KR	República de Corea	SG	Singapur
CH	Suiza	KZ	Kazajistán	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LR	Liberia	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LT	Lituania	TD	Chad
CZ	República Checa	LU	Luxemburgo	TG	Togo
DE	Alemania	LV	Letonia	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MC	Mónaco	TT	Trinidad y Tabago
EE	Estonia	MD	República de Moldova	UA	Ucrania
ES	España	MG	Madagascar	UG	Uganda
FI	Finlandia	ML	Mali	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón	MR	Mauritania	VN	Viet Nam

POLIHIDROXIESPIROSTANONAS COMO REGULADORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL

5 La presente invención se relaciona con la rama químico-biológica y en particular con un procedimiento para la obtención de nuevos análogos espirostánicos de brasinoesteroides a partir de sapogeninas esteroidales, mediante síntesis parcial, los cuales presentan actividad reguladora del crecimiento vegetal.

10 Los brasinoesteroides son compuestos esteroidales, con actividad reguladora de crecimiento vegetal que se encuentran en las plantas en muy pequeñas cantidades, por ello su obtención por métodos extractivos a partir de éstas resulta económicamente prohibitivo. Algunos de los compuestos naturales han sido obtenidos sintéticamente pero con rendimientos muy bajos, por ello la tendencia
15 actual es sintetizar análogos de estos compuestos .

La mayoría de ellos poseen (entre otras características estructurales típicas), un sistema $2\alpha,3\alpha$ - diol en el anillo A y una unión trans de los anillos A y B, del sistema esteroideal, atribuyéndole muchos científicos a esta peculiaridad una importancia
20 primordial en la actividad biológica que ellos pueden desempeñar.

Por ello, algunos de los análogos de brasinoesteroides sintetizados presentan los sustituyentes en las posiciones 2 y 3 del anillo A con estereoquímica α , los cuales muestran actividad como reguladores del crecimiento vegetal, (Kohout, L., Strnad,
25 M., Collect. Czech. Chem. Commun. **57**, 1731, 1992; Cerny, V., et al Collect. Czech. Chem. Commun. **51**, 687, 1986.)

Sin embargo, en los últimos años, se han aislado algunos brasinoesteroides naturales, biológicamente activos, que presentan un sistema 2,3-diol, pero con estereoquímica diferente (Ki Kim, S. "A.C.S. Symposium Series 474", Am. Chem.
30 Soc., USA., 26, 1991), como por ejemplo: la 2-epicastasterona ($2\beta,3\alpha$ -diol), la 3-epicastasterona ($2\alpha,3\beta$ -diol) y la 2,3-diepicastasterona ($2\beta,3\beta$ -diol). Por otra parte se han preparado análogos de brasinoesteroides con estereoquímica $2\beta,3\beta$ que son más activos que los análogos con estereoquímica $2\alpha,3\alpha$, así como análogos con el

H-5 β que son más activos que los que poseen el H-5 α (Kohout et al "A.C.S. Symposium Series 474", Am. Chem. Soc., USA., Cap.6, 1991).

Por otra parte, resulta interesante estudiar como influyen las variaciones en las posiciones de estos grupos hidroxílicos en el anillo A sobre la actividad biológica que estos compuestos ejercen.

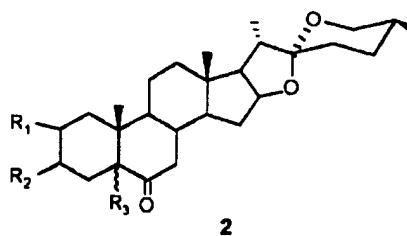
En la década del 80 fue publicado (Schwartz, R. et al, Revue Roumanie de Chimie, 29, 9-10, 755-759, 1984) la síntesis del (25R)-3 β -acetoxi-5 α -hidroxi-espirostan-6-ona como compuesto intermediario para la síntesis del 3 β -acetoxi-B-nor-5-androsten-17-ona y 3 β -acetoxi-B-nor-5-pregnen-20-ona, reportándose para su obtención la utilización de reacciones de acetilación con anhídrido acético y piridina, para obtener la diosgenina acetilada. Luego se realiza una epoxidación del doble enlace con acetato de sodio, cloroformo y ácido peracético al 14.5%, obteniéndose el epóxido correspondiente y posteriormente se oxida utilizando acetona y anhídrido crómico disuelto en agua.

La presente invención tuvo como objetivo inicial obtener a la (25R)-3 β ,5 α -dihidroxi-espirostan-6-ona, por lo que para ello se repitió la utilización del método anteriormente descrito hasta obtener el (25R)-3 β -acetoxi-5 α -hidroxi-espirostan-6-ona que constituiría el precursor del compuesto diol objeto de síntesis, notándose que en la oxidación del epóxido en las condiciones descritas, la reacción transcurre con dificultad y bajos rendimientos para producir el cetol correspondiente.

Además dicho proceso requiere de la acetilación de diosgenina con anhídrido acético y piridina a temperatura ambiente durante 24 horas, lo cual además del tiempo empleado conlleva a la utilización de la piridina reactivo que es tóxico.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado se decidió buscar un procedimiento para la síntesis de espirostanonas con funciones oxigenadas en distintas posiciones del anillo A con diferente estereoquímica de estos grupos sustituyentes, que tienen actividad como regulador de crecimiento vegetal, empleándose en su preparación procedimientos de síntesis asequibles y con

buenos rendimientos. Aquí se describe la obtención de nuevos espirobrasinoesteroides con la siguiente fórmula general:



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
2a	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H α
2 b	HO β	CH ₃ COO β	H α
2 c	CH ₃ COO β	HO β	H α
2 d	HO β	HO β	H α
2 e	HO β	HO β	H β
2 f	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H β
2g	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H α
2h	CH ₃ COO β	HO α	H α
2i	HO β	HO α	H α
2j	HO β	HO α	H β
2k	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H β
2l	CH ₃ COO α	CH ₃ COO β	H α
2m	HO α	HO β	H α
2n	HO α	HO α	H α
2ñ	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	H α
2o	H	CH ₃ COO β	HO α
2p	H	HO β	HO α
2q	H	HO β	HO β
2r	HO α	HO α	HO α
2s	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	HO α

Los compuestos con estas fórmulas generales presentan actividad reguladora del crecimiento vegetal.

Al compuesto (25R)-5 α -2-espirosten-6-ona (1) se le realizó una cis-hidroxilación β según el método reportado por Woodward (J.A.C.S., 80, 209, 1958), utilizando entre (10-15) partes en volumen de ácido acético seguido de acetato de plata, yodo y solución acuosa de ácido acético en proporciones molares de (2-2,5), (1-1,2), y (0,14-0,16) obteniéndose los productos **2a**, **2b** y **2c**.

También la reacción se puede llevar a cabo cambiando el acetato de plata por una cantidad equivalente de acetato de cobre (Mangoni, L. et al. Tetrahedron Letters, 1973; Horiuchi, Aakira C. J. Yasno Chemistry Letters, 1988).

La saponificación de **2a**, **2b** y **2c**, con carbonato de potasio o hidróxido de potasio (en proporción molar de 1,8-2,2) en un solvente adecuado producen **2d** y **2e**. Al compuesto **2e** se le realiza una reacción de acetilación y se forma **2f**.

Al compuesto (25R)-5 α -2-espirosten-6-ona (1) se le realiza una reacción de epoxidación según el método reportado por (Schwartz, N.M. et al, J.O.C., 29, 1979, 1964), utilizando entre (8-12) partes en volumen del solvente adecuado y el agente epoxidante en proporción molar de (2-2.5), al epóxido sintetizado se abre empleando entre (18-22) partes en volumen de ácido acético, obteniéndose los compuesto **2g** y **2h**.

La saponificación de una mezcla de los compuestos **2g** y **2h** con carbonato de potasio o hidróxido de potasio en proporción molar de (1.8-1.2) en solvente adecuado, produce los compuestos **2i** y **2j**. El compuesto **2k** se obtiene mediante una acetilación del compuesto **2j**.

El compuesto **2l** es obtenido por una oxidación directa del doble enlace del diacetato de yucagenina, utilizando (6-7) partes en volumen de tetrahydrofurano y solución de borano en 1,4-oxatiano en proporción molar de (2-2.5), seguido de disolución de NaOH 2 N, utilizando (1.5-2.5) partes en volumen y (6.5-7) partes en

volumen de H_2O_2 y seguidamente se le realiza una oxidación con (3-5) partes en volumen del reactivo de Jones .

El compuesto **2l** se saponifica de manera similar a los compuestos **2g** y **2h**,
5 obteniéndose el compuesto **2m**.

Al compuesto (25R)-5 α -2-espirosten-6-ona (**1**) se le realiza una cis hidroxilación α siguiendo el método reportado por Ishiguro et al. (Chem. Commun., 20, 962, 1980) utilizando tetrahidrofurano y agua entre (10-30) y (1-5) partes en volumen
10 respectivamente seguido de tetróxido de osmio y N-óxido de N-metilmorfolina en proporciones molares de (0.056-0.168) y (2.8-7) obteniéndose el producto **2n**. El compuesto **2n** se esterifica de forma similar a la realizada con el producto **2e** obteniéndose el compuesto **2ñ**.

15 El compuesto **2o** se obtiene por oxidación directa del acetato de diosgenina utilizando entre (20-40), (1-3) y (0.5-1) partes en volumen de acetona, anhídrido acético y peróxido de hidrógeno al 35% respectivamente y acetato de sodio en proporción molar de (1-2) y seguidamente se realiza otra oxidación con (1-3) partes en volumen del reactivo de Jones .

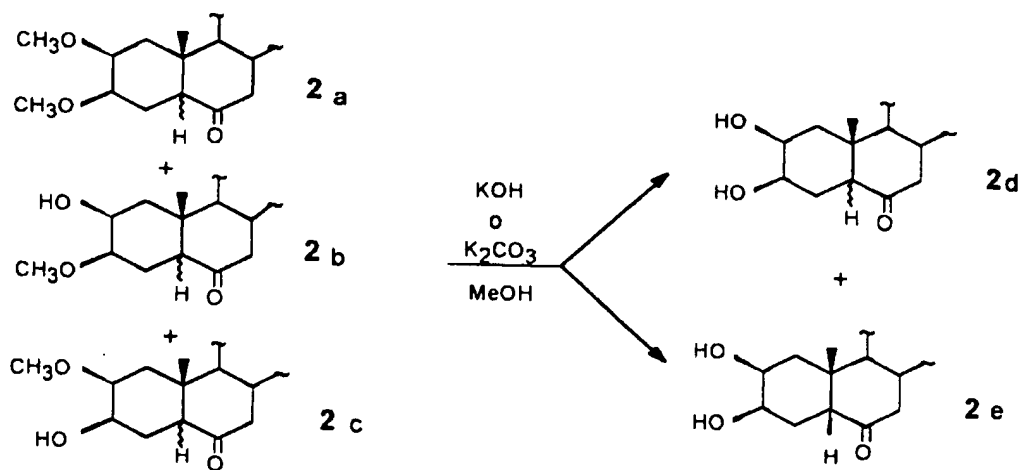
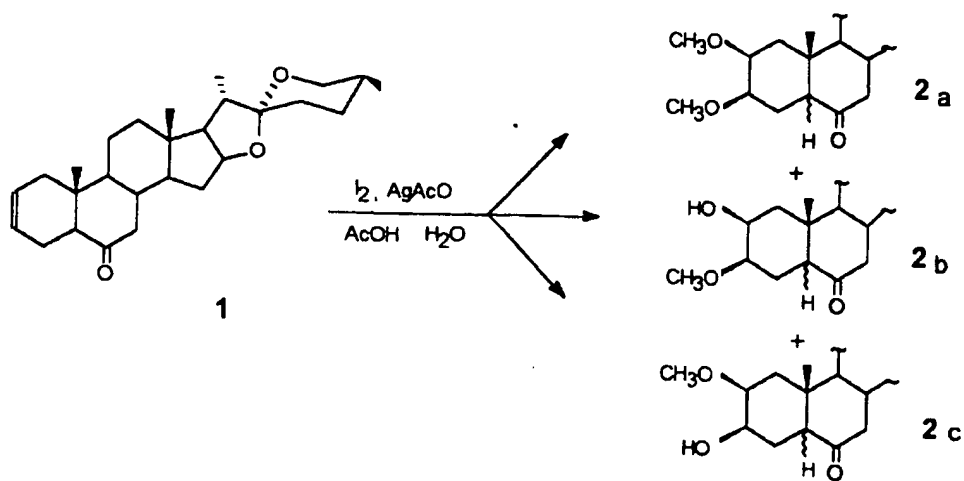
20

La saponificación de **2o** utilizando (10-20) parte en volumen de disolución de hidróxido de potasio en etanol al 5% produce los compuestos **2p** y **2q**.

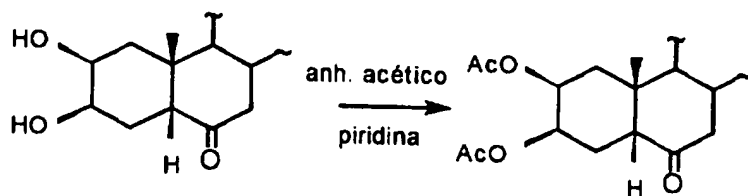
El compuesto **2p** se trata con cloruro de tosilo en proporción molar de (1-3) y (2-
25 5) partes en volumen de piridina seguido de la deshidrotosilación empleando una sal de litio en proporción molar entre (9-15) y (8-15) respectivamente y (1-4) parte en volumen de dimetilformamida. La oxidación del doble enlace se realiza de manera similar al compuesto **2n** obteniéndose el compuesto **2r**.

30 El compuesto **2r** se acetila de forma convencional obteniéndose el compuesto **2s**.

El esquema sintético seguido para la obtención de los productos fue:



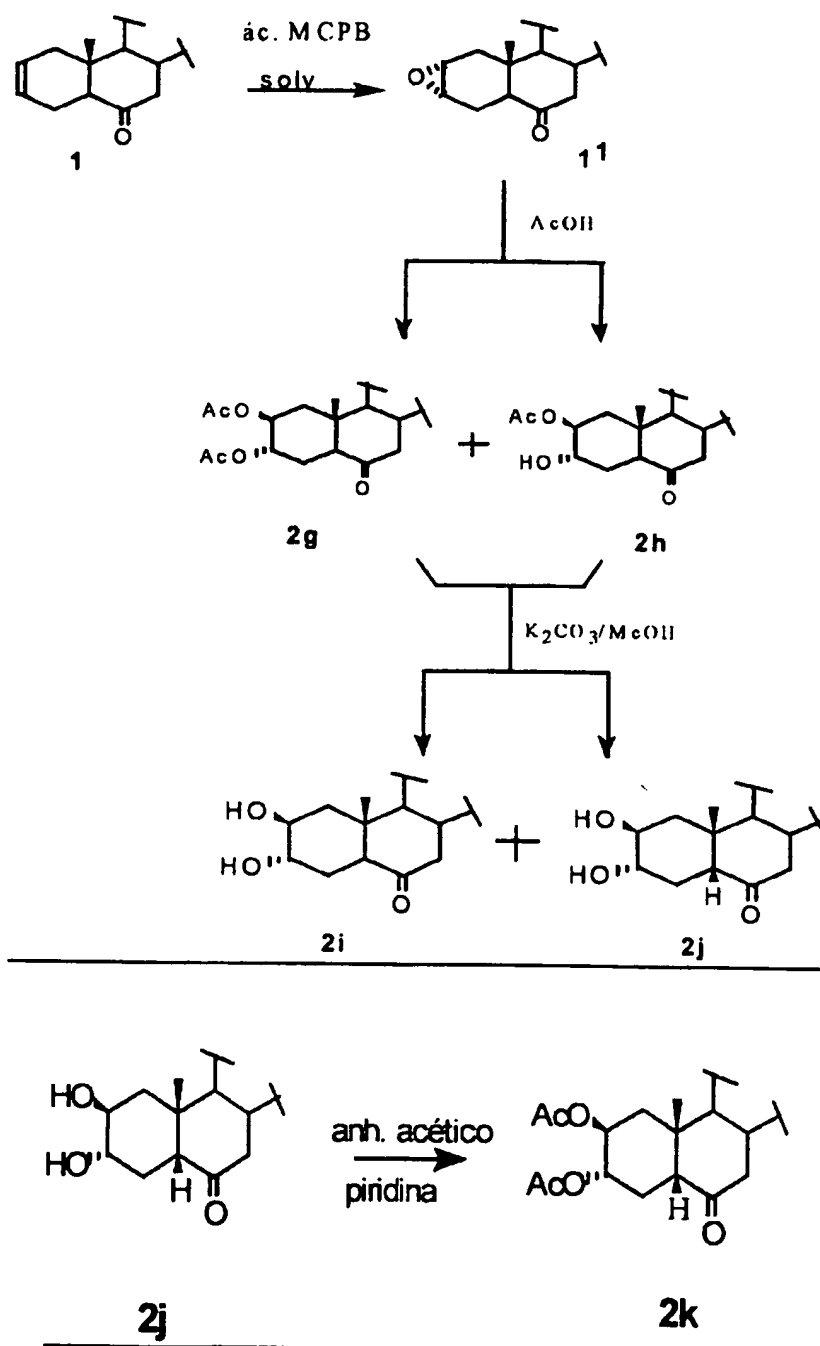
5

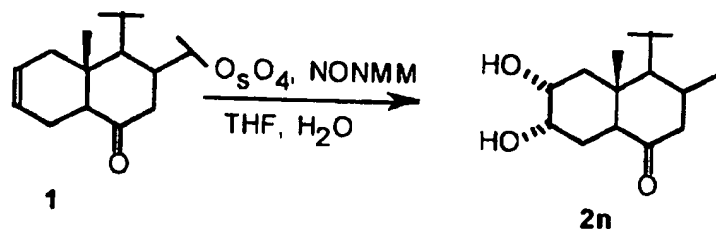
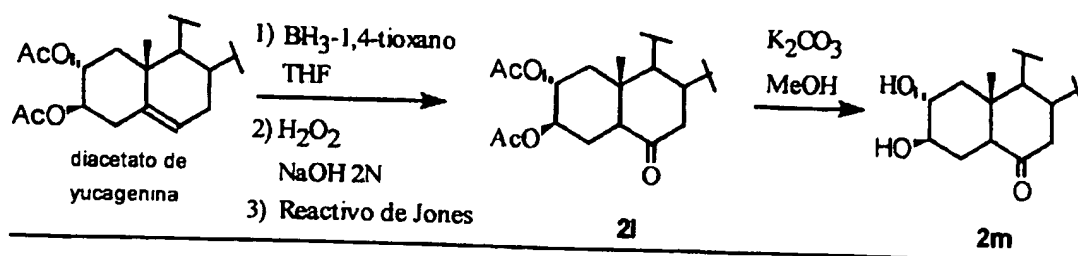


2e

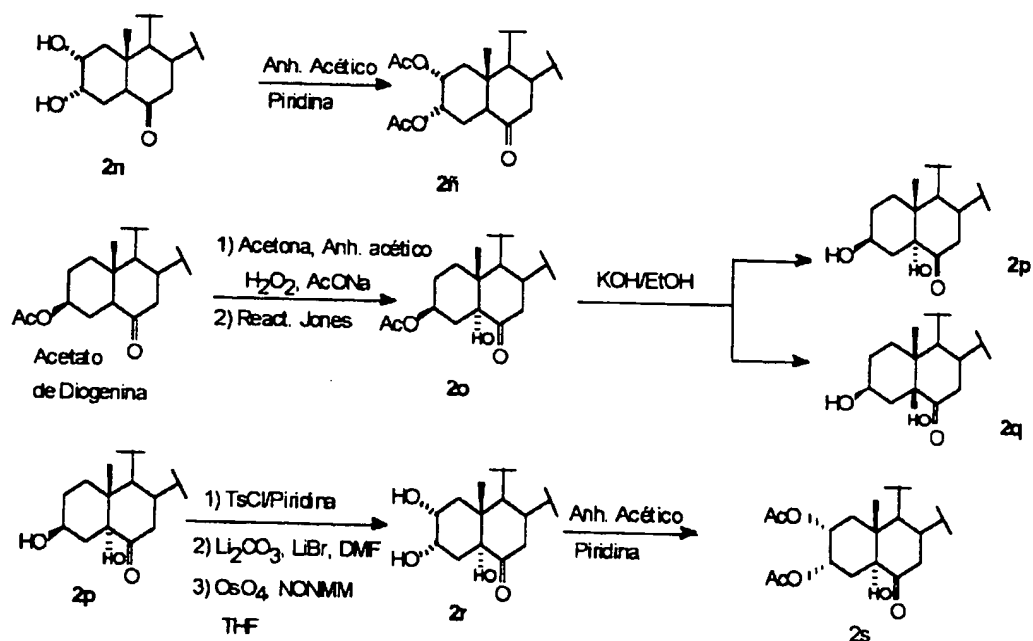
2f

10





5



Mediante la presente invención ha sido posible la obtención de veinte nuevos espirobrasinoesteroides con funciones oxigenadas en distintas posiciones del anillo A con diferente estereoquímica, los cuales mostraron actividad como reguladores del crecimiento vegetal.

El proceso sintético empleado utiliza reactivos químicos comunes y la mayoría de baja toxicidad.

Los compuestos sintetizados permiten incrementar el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como sus rendimientos agrícolas. Además se utilizan como aditivo en la conservación postcosecha de las flores

Ejemplos de realización.

10 Ejemplo 1

Seis gramos (14.5 mmol) del (25R)-5 α -2-espirosten-6-ona **1**, se disuelven en 67 mL de ácido acético glacial. A continuación se añaden 5.46 g (32.7 mmol) de acetato de plata. A esta mezcla se le adicionan 3.87 g (15.2 mmol) de yodo.

15 Posteriormente se añaden 2.18 mL de la solución acuosa de ácido acético y la mezcla de reacción se calienta.

Al concluir la reacción se añade cloruro de sodio y se filtran las sales insolubles. El filtrado se vierte sobre agua con agitación, se filtra a presión reducida y el sólido se disuelve en acetato de etilo.

A continuación se seca, se filtra y el solvente se evapora.

Rendimiento del crudo 6.63 g.

25

El crudo se purificó por cromatografía de columna. A continuación se mencionan en orden decreciente de R_f:

-(25R)-2 β , 3 β -diacetoxi-5 α -espirostan-6-ona (**2a**).

Rendimiento : 0.79 g (1.49 mmol, 10.2 %).

30

Temperatura de fusión : 198-199 °C.

-(25R)-2 β -hidroxi-3 β -acetoxi-5 α -espirostan-6-ona (**2b**).

Rendimiento : 0.784 g (1.61 mmol, 11.03 %).

Temperatura de fusión : 204-205 °C.

-(25R)-2 β -acetoxi-3 β -hidroxi-5 α -espirostan-6-ona (**2c**).

Rendimiento : 1.124 g (2.30 mmol, 15.83 %).

Temperatura de fusión : 209-210 °C.

5

También se obtuvieron 2.7 g de una mezcla impura de los dos compuestos más polares.

Ejemplo 2.

10

Síntesis de la (25R)-2 β , 3 β -dihidroxi-5 α -espirostan-6-ona (**2d**).

Un gramo de la mezcla de los compuestos 2a, 2b y 2c se disuelve en 78 mL de metanol, se le añaden 0.49 g de carbonato de potasio, reflujiéndose. Concluida la
15 reacción esta se trabaja de manera usual.

Rendimiento del crudo : 700 mg.

El crudo se purificó por cromatografía de columna. Obteniéndose dos productos,
20 siendo éste el menos polar.

Rendimiento: 0.5 g (1,12 mmol, 62.5 %).

Temperatura de fusión: 224-225 °C

Ejemplo 3.

25

Síntesis de la (25R)-2 β ,3 β -dihidroxi-5 β -espirostan- 6-ona (**2e**).

Se aísla como producto más polar de la columna referida en el ejemplo de realización 2.

Rendimiento: 0.1 g (0.18 mmol, 11.8%).

30

Temperatura de fusión: 193 -195 °C.

Los compuestos referidos en la presente invención pueden ser utilizados como principios activos de una formulación que presenta propiedades como regulador del crecimiento vegetal y como aditivo para la conservación postcosecha de flores.

Como reguladores del crecimiento de las plantas los compuestos de la presente invención pueden prepararse como formulación líquida o en una solución acuosa, mezclando el ingrediente activo con uno o varios tipos de agentes líquidos entre ellos solventes orgánicos convencionales tales como alcohol etílico (500-1000 mL) y dimetilformamida (20-60g), entre otros. Aplicándose como sólido, como formulación líquida, etc, mezclado con los fertilizantes, pesticidas herbicidas, etc.

En la preparación de la formulación puede adicionarse un agente de superficie activo como por ejemplo, Tween-20 (0.05-0.1%) para mejorar su dispersabilidad al preparar a partir de una formulación líquida concentrada una solución acuosa para su aplicación a la planta. Esta formulación resulta estable a temperaturas menores de 35° C por periodos hasta un año.

Los compuestos referidos en la presente invención pueden aplicarse en concentraciones de 10^{-4} a 10 ppm y en dosis dentro del rango de 0,1 a 1000 mg/Ha, dependiendo del cultivo, el estado vegetativo de la planta y las condiciones edafoclimáticas, entre otros.

A los productos sintetizados se les determinó su propiedad de reguladores del crecimiento vegetal mediante los bioensayos de:

1. Crecimiento del hipocotilo y expansión de los cotiledones del rábano.
2. Retención de la degradación de los pigmentos fotosintéticos en hojas de trigo.

En el primer bioensayo se emplearon soluciones con una concentración del principio activo entre 0.01-10 ppm, obteniéndose un incremento de la longitud del hipocotilo entre $1,1 \pm 0.22$ cm, así como un incremento en el peso de los cotiledones.

Además fue corroborada la bioactividad de los mismos mediante pruebas en campo hasta 1 Ha con diferentes cultivos, como por ejemplo:

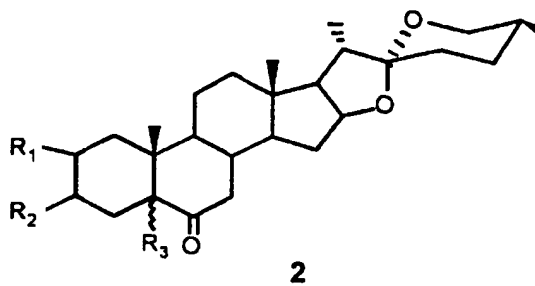
CULTIVO	CONCENTRACIÓN	INCREMENTO DEL REND.
Cebolla	0.1-1 ppm	21-40 %
Ají	0.5-1 ppm	8-50 %
Ajo	0.1-0.5 ppm	2-15 %
Papa	0.1-10 ppm	18-25 %
Maíz	0.1-0.5 ppm	10-47%
Soya	0.1-1 ppm	9-34%
Sorgo	0.1-1 ppm	Aproxim. 15%
Arroz	0.1-1 ppm	12%
Tomate	0.1-1 ppm	6-11%

5 ***Ventajas de la solución técnica propuesta:***

- Se ha logrado la obtención de veinte nuevos espirobrasinoesteroides con funciones oxigenadas en distintas posiciones del anillo A con diferente estereoquímica que presentaron actividad como reguladores del crecimiento vegetal.
- El proceso sintético empleado utiliza reactivos químicos comunes y la mayoría de baja toxicidad.
- Los compuestos sintetizados permiten incrementar el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como sus rendimientos agrícolas. Además se utilizan como aditivo en la conservación postcosecha de las flores

REIVINDICACIONES

1. Espirostanonas con funciones oxigenadas en el anillo A, como reguladores del crecimiento y su procedimiento de obtención, caracterizadas por la fórmula general (2):



5

donde:

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
2a	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H α
2 b	HO β	CH ₃ COO β	H α
2 c	CH ₃ COO β	HO β	H α
2 d	HO β	HO β	H α
2 e	HO β	HO β	H β
2 f	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H β
2g	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H α
2h	CH ₃ COO β	HO α	H α
2i	HO β	HO α	H α
2j	HO β	HO α	H β
2k	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H β
2l	CH ₃ COO α	CH ₃ COO β	H α
2m	HO α	HO β	H α
2n	HO α	HO α	H α
2ñ	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	H α

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃
2o	H	CH ₃ COO β	HO α
2p	H	HO β	HO α
2q	H	HO β	HO β
2r	HO α	HO α	HO α
2r	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	HO α

2. Procedimiento para la síntesis de derivados de espirobrasinoesteroides según la reivindicación No. 1 caracterizado porque dichos compuestos se obtienen a partir de sapogeninas esteroidales mediante las siguientes reacciones químicas:

- 5 a- Reacción de cis-hidroxilación β al compuesto (25R)-5α-2-espirosten-6-ona (1), utilizando entre (10 -15) partes en volumen de ácido acético seguido de acetato de plata, yodo y solución acuosa de ácido acético en proporciones molares de (2 - 2,5) , (1 - 1,2), y (0,14 - 0,16), obteniéndose los productos **2a**, **2b** y **2c**.
- 10 b- La saponificación de **2a**, **2b** y **2c**, con carbonato de potasio o hidróxido de potasio (en proporción molar de 1,8-2,2) en metanol producen **2d** y **2e**. Al compuesto **2e** se le realiza una reacción de acetilación y se forma **2f**.
- 15 c- Reacción de epoxidación del compuesto (25R)-5α-2-espirosten-6-ona (1) utilizando entre (8-12) partes en volumen de cloroformo y ácido MCPB en proporción molar de (2-2.5), el epóxido sintetizado se abre empleando entre (18-22) partes en volumen de ácido acético, obteniéndose los compuesto **2g** y **2h**.
- 20 d- La saponificación de una mezcla de los compuestos **2g** y **2h** con carbonato de potasio o hidróxido de potasio en proporción molar de (1.8-1.2) en metanol, produce los compuestos **2i** y **2j**. El compuesto **2k** se obtiene mediante una acetilación del compuesto **2j**, empleando anh. acético y piridina a partes iguales.
- 25 e- El compuesto **2l** se obtiene por una oxidación directa del doble enlace del diacetato de yucagenina, utilizando (6-7) partes en volumen de tetrahidrofurano y

solución de borano en 1,4-oxatiano en proporción molar de (2-2.5), seguido de disolución de NaOH 2 N, utilizando (1.5-2.5) partes en volumen y (6.5-7) partes en volumen de H₂O₂ y seguidamente se le realiza una oxidación con (3-5) partes en volumen del reactivo de Jones .

5

f- El compuesto **2l** se saponifica de manera similar a los compuestos **2g** y **2h**, obteniéndose el compuesto **2m**.

10

g- Reacción de cis hidroxilación α al compuesto al (25R)-5 α -2-espirosten-6-ona (**1**), utilizando tetrahidrofurano y H₂O entre (10-30) y (1-5) partes en volumen respectivamente seguido de la adición de tetróxido de osmio y N-óxido de N-metil morfolina en proporciones molares (0.056-0.168) y (2.8-7) obteniéndose el producto **2n**. El compuesto **2n** se esterifica de forma similar a la realizada con el producto **2e** obteniéndose el compuesto **2ñ**.

15

h- El compuesto **2o** se obtiene por oxidación directa del acetato de diosgenina utilizando entre (20-40), (1-3) y (0.5-1) partes en volumen de acetona, anhídrido acético y peróxido de hidrógeno al 35% respectivamente y acetato de sodio en proporción molar de (1-2) y seguidamente se realiza otra oxidación con (1-3) partes en volumen del reactivo de Jones .

20

i- La saponificación de **2o** utilizando (10-20) parte en volumen de disolución de hidróxido de potasio en etanol al 5% produce los compuestos **2p** y **2q**.

25

j- Reacción de tosilación al compuesto **2p** con cloruro de tosilo en proporción molar de (1-3) y (2-5) partes en volumen de piridina seguido de la deshidotosisilación empleando una sal de litio en proporción molar entre (9-15) y (8-15) respectivamente y (1-4) parte en volumen de dimetilformamida. La oxidación del doble enlace se realiza de manera similar al compuesto **2n** obteniéndose el compuesto **2r**.

30

k- Reacción de acetilación del compuesto **2r** de manera similar a lo planteado en el apartado a) de la reivindicación Número 2 para dar lugar al producto **2s**.

3. Espirostanonas obtenidas según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque son utilizadas como reguladores del crecimiento vegetal.
4. Análogos espirostánicos de brasinoesteroides según las reivindicaciones de la 1 a la 3 caracterizados porque son utilizados como reguladores del crecimiento vegetal y como preservantes en flores.
5. Formulación que contiene las espirostanonas o los análogos espirostánicos de brasinoesteroides de las reivindicaciones de la 1 a la 4 caracterizada por ser una formulación acuosa que contiene entre 10^{-4} - 100 ppm del principio activo y que puede ser aplicada sola o mezclada con herbicidas, pesticidas, fertilizantes, etc, que sean solubles en agua.
6. Uso de las espirostanonas o los análogos espirostánicos de brasinoesteroides de las reivindicaciones de anteriores como reguladores del crecimiento vegetal y como preservante en flores

15

20

4 11 05 98

(3)

English translation of text as originally filed

POLYHYDROXYSPIROSTANONES AS REGULATORS PLANT

GROWTH.

This invention is related to the chemical-biological sector and in particular by a
5 procedure for to obtain new spirostan analogs of brassinosteroids based on
steroidal sapogenins, through partial synthesis. These spirostan analogs have a
regulating effect on plant growth.

Brassinosteroids are steroidal compounds, with a regulating activity on plant-
10 growth and which are found in very small quantities in plants. For this reason
extracting them from plants is economically prohibitive. Some of the natural
compounds have been obtained synthetically but with very low yields, thus the
current tendency is to synthesize analogs of these compounds.

15 The majority of them possess (among other typical structural requirements), a
2 α ,3 α - diol system in the A ring and a union trans of the A and B rings, of the
steroidal system. Many scientists attribute a relevant importance to this peculiarity
because of the biological activity that they are able to carry out.

20 For that reason, some of the analogs of synthesized brassinosteroids present
substituents in positions 2 and 3 of the A ring with alpha stereochemical, which
exhibit activity as regulators of plant growth, (Kohout, L., Strnad, M., Collect. Czech.
Chem. Commun. 57, 1731, 1992; Cerny, V., et al Collect. Czech. Chem. Commun.
51, 687, 1986.)

25 However, in recent years, some biologically active natural brassinosteroids,
have been isolated. These present a system 2 α ,3 α -diol, but with a different
stereochemistry (Ki Kim, S. "A.C.S. Symposium Series 474", Am. Chem. Soc.,
USA., 26, 1991), like for example: 2-epicastasterone (2 β ,3 α -diol), 3-epicastasterone
30 (2 α ,3 β -diol) and 2 β ,3 β -diepicastasterone (2,3-diol). On the other hand analogs of
brassinosteroids with stereochemistry 2 β ,3 β that are more active than the analogs
with stereochemistry 2 α ,3 α have been prepared, as well as analogs with the H-5 β
which are more active than those which possess H-5 α (Kohout et al "A.C.S.
Symposium Series 474", Am. Chem. Soc., USA., Cap.6, 1991).

H 11.05.93

It is also interesting to study how variations in the positions of these hydroxylic groups in the A ring influence the biological activity that these compounds exert.

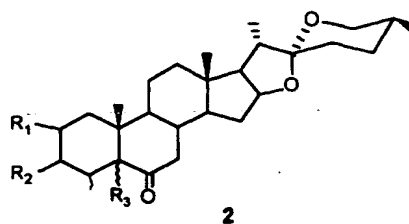
5 In 1984 Schwantz, R. et al, (Revue Roumanie of Chimie, 29, 9-10, 755-759, 1984) published the synthesis of the (25R) 3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-spirostan-6-one as an intermediary compound for the synthesis of 3 β -acetoxy-B-nor-androst-5-en-3 β -ol-17-one and 3 β -acetoxy-B-nor-pregn-5-en-3 β -ol-20-one, by utilizing acetylation reactions with acetic anhydride and pyridine, to obtain the acetate of diosgenin.
10 Then an epoxidation of the double bond with sodium acetate, chloroform and peracetic acid at 14.5%, is performed to obtain the corresponding epoxide and subsequently it is oxidized utilizing acetone and chromic anhydride dissolved in water.

15 In the present invention, with the purpose of obtaining the compounds with hydroxyl substituents in the positions 3 and 5, for example: the (25R) 3 β ,5 α -dihydroxy-spirostan-6-one and the (25R) 3 β ,5 β -dihydroxy-spirostan-6-one, the previously described methods was repeated, until (25R)3 β -acetoxy-5 α -hydroxy-spirostan-6-one which constitutes the precursor of the diol compound was obtained,
20 noting that in the epoxide oxidation with the above mentioned conditions, the reaction takes place with difficulties and low yields to produce the corresponding ketol.

Also this process requires the acetylation of diosgenin with acetic anhydride and
25 pyridine at room temperature for 24 hours, which, in addition to the time required involves the utilization of a pyridine reagent which is toxic.

Bearing this in mind it was decided to look for a procedure for the synthesis of spirostanones with oxygenating functions in different positions of the A ring with a
30 different stereochemistry to utilize more feasible and higher yield procedures in their preparation. The methods used to new spirobrassinosteroids with the general formula is described below:

H 11.05.98



Compounds

R₁

R₂

R₃

2a	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H α
2b	HO β	CH ₃ COO β	H α
2c	CH ₃ COO β	HO β	H α
2d	HO β	HO β	H α
2e	HO β	HO β	H β
2f	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H β
2g	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H α
2h	CH ₃ COO β	HO α	H α
2i	HO β	HO α	H α
2j	HO β	HO α	H β
2k	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H β
2l	CH ₃ COO α	CH ₃ COO β	H α
2m	HO α	HO β	H α
2n	HO α	HO α	H α
2ñ	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	H α
2o	H	CH ₃ COO β	HO α
2p	H	HO β	HO α
2q	H	HO β	HO β
2r	HO α	HO α	HO α
2s	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	HO α

H 11.05.98

The compounds with these general formulas present a regulating activity on plant growth.

5 A cis-hydroxilation β , following the method recorded by Woodward (J.A.C.S., 80, 209, 1958), was carried out on the compound utilizing between 10-15 portions in acetic acid volume, followed by silver acetate, iodine and a water solution of acetic acid in molar molar of (2-2,5), (1-1,2), and (0,14-0,16), to obtain products 2a, 2b and 2c.

10

The reaction can also be carried out changing the silver acetate for an equivalent quantity of copper acetate (Mangoni, L. et al. Tetrahedron Letters, 1973; Horiuchi, Aakira C. J. Yasno Chemistry Letters, 1988).

15 The saponification of 2a, 2b and 2c, with potassium carbonate or potassium hydroxide (in molar proportion of 1,8-2,2) in an appropriate solvent produces 2d and 2e. An acetilation reaction is carried out on the compound 2f is formed.

20 An epoxidation reaction according to the method reported by (Schwartz, N.M. et al, J.O.C., 29, 1979, 1964), is carried out on the compounds (25R) 5 α -2-spirosten-6-one (1), utilizing between (8-12) portions in volume of the appropriate solvent and the epoxidant agent in molar proportion of (2-2.5), the synthesized epoxide is opened using between (18-22) parts in acetic acid volume, to obtain compounds 2g and 2h.

25

The saponification of a mixture of compounds 2g and 2h with potassium carbonate or potassium hydroxide in molar proportion of (1.8-1.2) in appropriate solvent, produce the compounds 2i and 2j. The compound 2k is obtained by means of an acetilación of compound 2j.

30

Compound 2l is obtained by direct oxidation of the double bond of diacetate of yucagenin utilizing (6-7) parts in volume of tetrahydrofurane and a solution of borane in 1,4-oxatiane in a molar proportion of (2-2.5), followed by the dissolution of

H 11.05.98

NaOH 2 N, utilizing (1.5-2.5) parts in volume and (6.5-7) parts in volume of H_2O_2 , followed by an oxidation with (3-5) parts in volume of Jones reagent.

Compound 2l is saponificated in a similar manner to compounds 2g and 2h, to
5 obtain the compound 2m.

A cis hidroxylation α following the method reported by Ishiguro et al. (Chem. Commun., 20, 962, 1980) is carried out on compound (25R) 5α -2-spirosten-6-one (1) utilizing tetrahydrofurane and water between (10-30) and (1-5) parts in volume
10 respectively, followed by tetroxide of osmium and N-oxide of N-methylmorpholin in molar proportions of (0.056-0.168) and (2.8-7) to obtain the product 2n. The compound 2n is esterified in a similar way to that carried out on product 2e, to obtain the compound 2ñ.

15 The compound 2o is obtained by the direct oxidation of acetate of diosgenin utilizing between (20-40), (1-3) and (0.5-1) parts in volume of acetone, acetic anhydride and hydrogen peroxide at 35% respectively and sodium acetate in a molar proportion of (1-2), followed by another oxidation with (1-3) parts in volume of the Jones reagent.

20

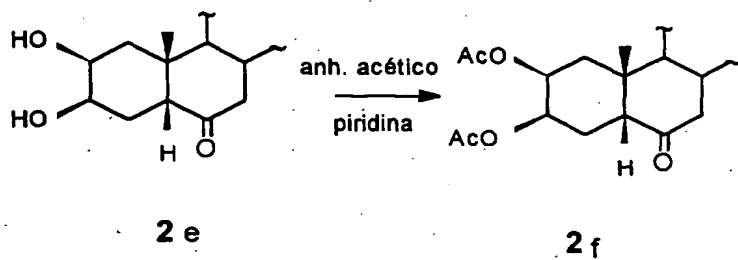
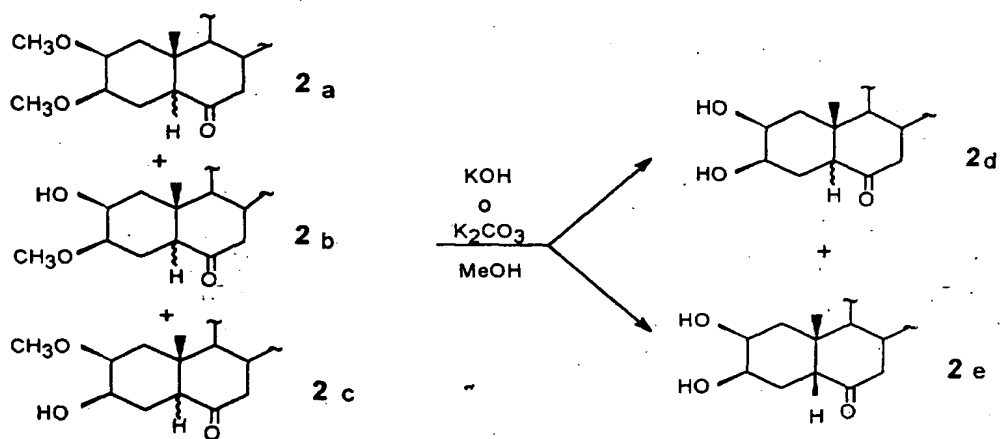
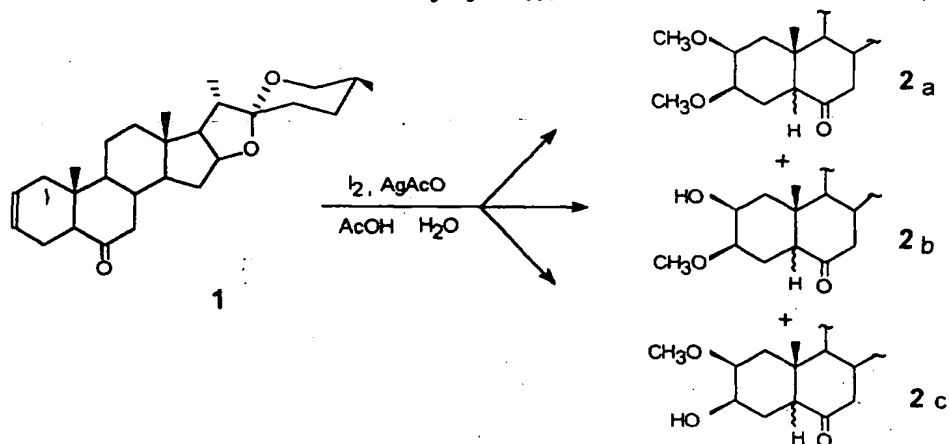
The saponification of 2o utilizing (10-20) part in volume potassium hydroxide dissolved in ethanol at 5% produces compounds 2p and 2q.

25 The compound 2p is treated with tosyl chloride in a molar proportion of (1-3) and (2-5) parts in volume of pyridine followed by the deshydrotosylation using a lithium salt in a molar proportion between (9-15) and (8-15) respectively and (1-4) part in volume of dimethylformamide. The oxidation of the double bond is carried out in a similar manner on compound 2n, to obtain the compound 2r.

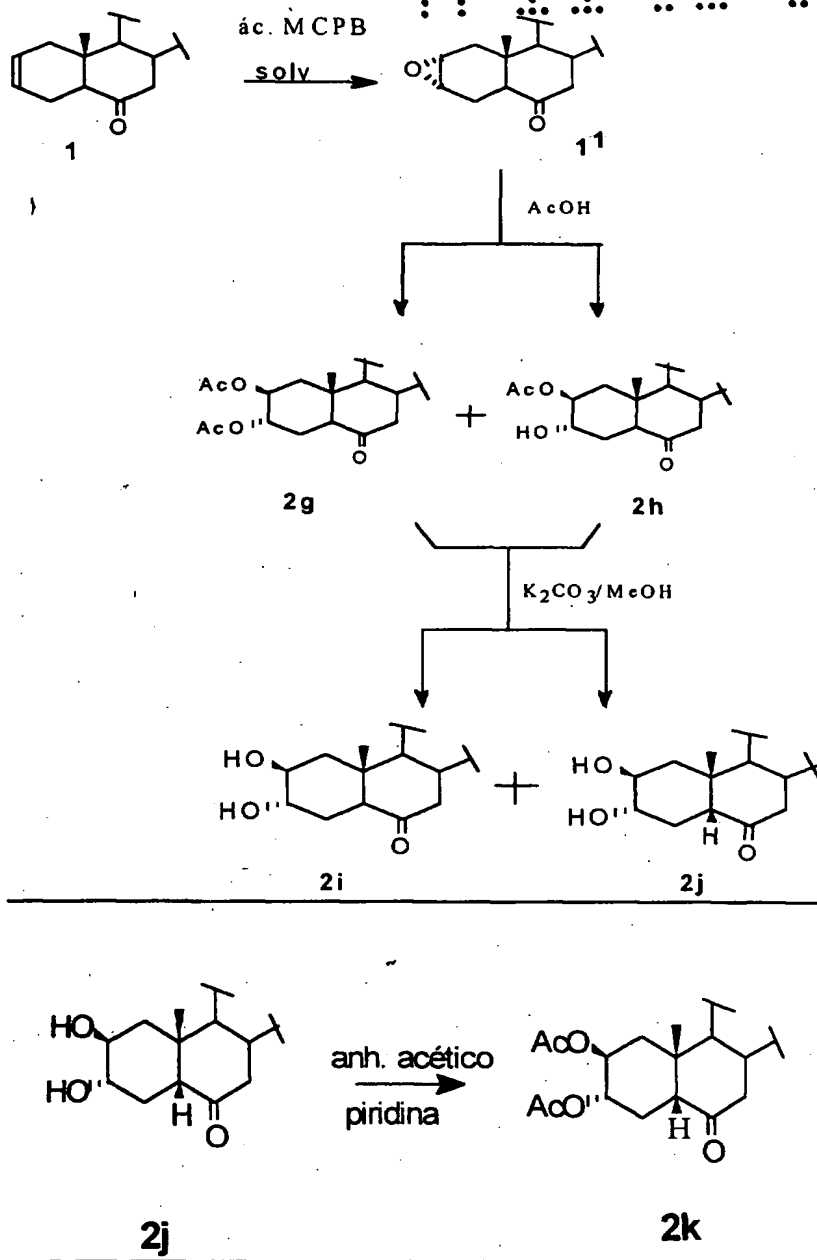
30 The compound 2r is acetilated in the conventional form, to obtain compound 2s.

The synthetic scheme followed to obtain the products was:

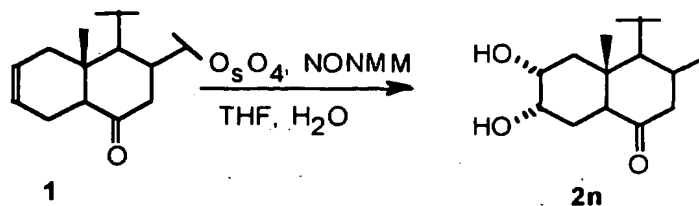
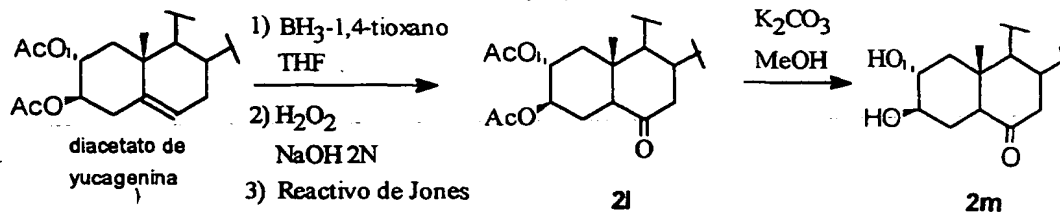
H 11.05.98



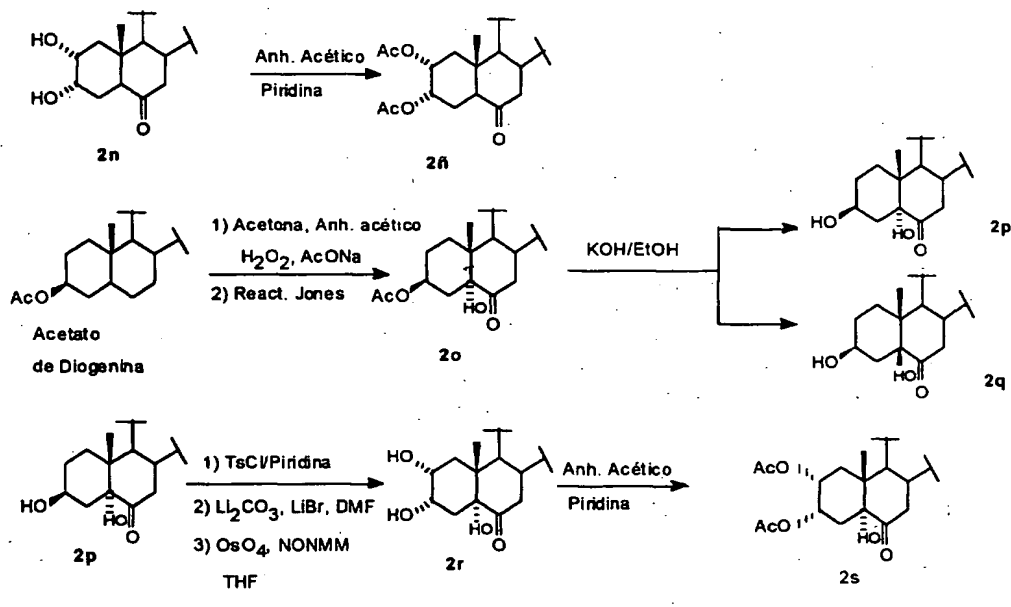
H 11.05.98



H 11.05.98



5



10

This invention made possible to obtain twenty new spirobrassinosteroids with oxygenating functions in different positions of the A ring with a different stereochemistry, that demonstrate activity as controllers of plant growth.

H 11.05.98

The synthetic process utilizes common chemical reagents most of them with low toxicity.

The synthesized compounds facilitate the increased growth and development of the plants, as well as their agricultural yields. They are additionally use as an additive in the post-harrest conservation of the flowers.

Examples of the process.

10 Example 1

Six grams (14.5 mmol) of (25R) 5 α -2-espirosten-6-one (1), is dissolved in 67 ml of glacial acetic acid. Next 5.46 g (32.7 mmol) of silver acetate is added. 43.87 g, (15.2 mmol) of iodine is added to this mixture.

15 Subsequently 2.18 mL of a water solution of acetic acid is added and the reaction mixture is heated.

When the reaction is concluded sodium chloride is added and the insoluble salts
20 filtered out. The filtrate is pored on the water by agitation, and then it is filtered by reduced pressure and the solid is dissolved in ethyl acetate.

Next it is dried, filtered and the solvent is evaporated.

25 Crude yields of 6.63 g.

The crude was purified by column chromatography. They are subsequently mentioned in decreasing order of Rf:

30 -(25R)-2 β , 3 β -diacetoxy-5 α -spirostan-6-one (2a).

Yield: 0.79 g (1.49 [mmol], 10.2%).

Melting point: 198-199 °C.

-(25R)-2 β -hydroxy-3 β -acetoxy-5 α -spirostan-6-one (2b).

35 Yield: 0,784 g (1.61 [mmol], 11.03%).

Melting point: 204-205 °C.

H 11.05.98

- (25R) 2 β -acetoxy-3 β -hydroxy-5 α -spirostan-6-one (2c).

Yield : 1.124 g (2.30 mmol, 15.83 %).

Melting point: 209-210 °C.

5

2.7 g of an impure mixture of the two most polar compounds was also obtained.

Example 2.

10

Synthesis of (25R) 2 β , 3 β -dihydroxy-5 β -spirostan-6-one (2d).

One gram of the mixture of compounds 2a, 2b and 2c is dissolved in 78 mL of methanol, adds 0.49 g of potassium carbonate is added and flow back. When the reaction is completed the following steps proceeds in the usual way.

15

Crude yields: 700 mg.

The crude was purified by column chromatography to obtain two products, this being the least polar.

20

Yield: 0.5 g (1,12 mmol, 62.5 %).

Melting point: 224-225 °C

Example 3.

25

Synthesis of the (25R) 2 β ,3 β -dihydroxy-5 β -spirostan- 6-one (2e).

This compound was isolated like more polar product of the column related in the example of realization 2.

30

Yield: 0.1 g (0.18 mmol, 11.8%).

Melting point: 193 -195 °C.

H 11.05.98

The compounds referred in this invention can be utilized as the active principles of a formulation that presents properties as vegetal growth regulator and as an additive for the post-harvest conservation of flowers.

5 As regulator of plant growth the compounds in this invention can be prepared in liquid form or in a water solution, mixing the active ingredient with one or various types of liquid agents including organic solvents such as ethanol (500-1000 mL) and dimethylformamide (20-60g), among others. Can be applied as well as a solid, or a liquid formulation, etc, mixed with fertilizers, pesticides, herbicides, etc.

10 When preparing the formula an active surface agent such as tween-20 (0.05-0.1 %) can be added to improve its dispersability, by preparing a water solution for the concentrated liquid formula for its application to the plant. This formulation results stable to minor temperatures of 35°C for periods until one year.

15 The compounds referred in this invention can be applied in concentrations of 10^{-4} to 10 ppm and in a dose within the range of 0.1 to 1000 mg/ha depending on the vegetative state of the plant and the edaphoclimatic conditions, among other factors.

The property as plant growth regulator of the synthesized products was
20 determined by means of bioassays:

1. Hypocotyl elongation and expansion of the radish cotyledons
2. Retention of the degradation of the photosynthetic pigments in wheat leaves

25 In the first bioassay, solutions with a concentration of the active principle between 0.01-10 [ppm] were employed, to obtain an increase in the length of the hypocotyl between 1.1 ± 0.22 cm, as well as an increment in the weight of the cotyledons. Moreover, the bioactivity of the compounds was corroborated by means of the same field test up to 1Ha with various cultivars, for example:

30

CULTIVAR	CONCENTRATION	YIELD INCREASE (AVERAGE %)
Onion	0.1-1 ppm	21-40 %
Pepper	0.5-1 ppm	8-50 %
Garlic	0.1-0.5 ppm	2-15 %

H 11.05.99

Potato	0.1-10 ppm	18-25 %
Corn	0.1-0.5 ppm	10-47 %
Soy bean	0.1-1 ppm	9-34 %
Sorghum	0.1-1 ppm	Aproxim. 15 %
Rice	0.1-1 ppm	12 %
Tomato	0.1-1 ppm	6-11%

Advantages of the proposed technical solution:

5 * Twenty new spirobrassinosteroids with oxigenating functions in different positions of the A ring with diferent stereochemistry that presented activity as regulator of plant growth have been obtained.

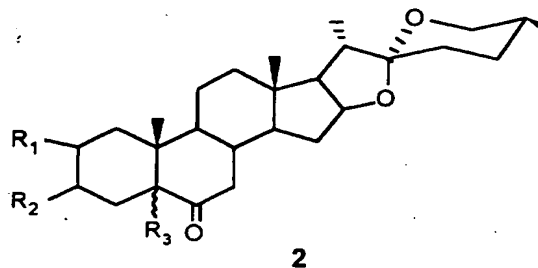
 * The synthetic process employed utilizes common chemicals reagents, the majority with low toxicity.

10

 * The synthesized compounds allow to increased growth and development of the plants, as well as their agricultural yields. They can also be utilized as an additive in the postcosecha conservation of flowers.

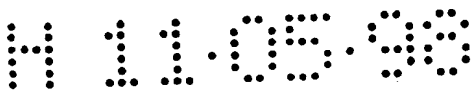
1. Spirostanones with oxygenating functions in the A ring, as regulator of growth and their preparation procedure, characterized by general formula (2):

5



where:

Compounds	R ₁	R ₂	R ₃
2a	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H α
2b	HO β	CH ₃ COO β	H α
2c	CH ₃ COO β	HO β	H α
2d	HO β	HO β	H α
2e	HO β	HO β	H β
2f	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H β
2g	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H α
2h	CH ₃ COO β	HO α	H α
2i	HO β	HO α	H α
2j	HO β	HO α	H β
2k	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H β
2l	CH ₃ COO α	CH ₃ COO β	H α
2m	HO α	HO β	H α
2n	HO α	HO α	H α

			
2ñ	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	H α
2o	H	CH ₃ COO β	HO α
2p	H	HO β	HO α
2q	H	HO β	HO β
2r	HO α	HO α	HO α
2s	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	HO α

2. The procedure for the synthesis of derivatives spirobrassinosteroids as claim No. 1 is characterized because such compound are obtained by means of steroidal sapogenin through the following chemistry reactions:

a- cis-hydroxylation β reaction to (25R) 5α-2-spirosten-6-one (1), compound is carry out by preparing between (10- 15) portions in acetic acid volume followed by silver acetate, iodine and water solution of acetic acid in molars proportions of (2- 2,5), (1- 1,2), and (0,14- 0,16), to obtain products 2a, 2b and 2c.

b- The saponification of 2a, 2b and 2c, with potassium carbonate or potassium hydroxyde (in molar proportion of 1,8-2,2) in methanol produces 2d and 2e. Acetilation reaction is carried out on compound 2e and 2f is formed.

c- An epoxidation reaction on the compound (25R) 5α-2-spirosten-6-one (1) is carried out between (8-12) portions in chloroform volume and MCPB acid in molar proportion of (2-2.5). The synthesized epoxid is opened by using between (18-22) portions in acetic acid volume to obtain compounds 2g and 2h.

d- The saponification of a mixture of compounds 2g and 2h with potassium carbonate or potassium hydroxyde in molar proportion of (1.8-1.2) in methanol, produce compounds 2i and 2j. The compound 2k is obtained by means of a acetilation of the compound 2j, employing equal parts of acetic anhydride and pyridine.

H 110598

e- The compound 2l is obtained by direct oxidation of the yucagenin diacetate double bond, utilizing (6-7) portions of tetrahydrofurane in volume and borane-1,4-oxatiane solution in molar proportion of (2-2.5), followed by NaOH 2N, solution utilizing (1.5-2.5) portions in volume and (6.5-7) parts in volume of H₂O₂ and successively carried out an oxidation with (3-5) parts in volume of Jones reagent.

f- The saponification of compound 2l was carried out in a similar way as in compounds 2g and 2h, to obtain the compound 2m.

g- The reaction of cis hydroxylation to (25R) 5-2-spirosten-6-one (1) compound, utilizing tetrahydrofurane and H₂O between (10-30) and (1-5) parts in volume respectively followed from the addition of osmium tetroxide and N-oxide of N-methylmorpholine in molar proportions (0.056-0.168) and (2.8-7) is to obtain 2n product. esterificated in similar way as product 2e to obtain the compound 2ñ

h- The compound 2o is obtained through direct oxidation of diosgenin acetate utilizing between (20-40), (1-3) and (0.5-1) parts in volume of acetone, acetic anhydride and hydrogen peroxide at 35% respectively and sodium acetate in molar proportion of (1-2) and followed by a further oxidation with (1-3) parts in volume of Jones reagent.

i- The saponification of 2o utilizing (10-20) part in volume of potassium hydroxyde disolution in ethanol at 5% yield the compounds 2p and 2q.

j- Reaction of tosilation to compound 2p with tosyl chloride in molar proportion of (1-3) and (2-5) parts in volume of pyridine followed the deshydrotosilation using a salt of lithium in molar proportion between (9-15) and (8-15) respectively and (1-4) part in volume of dimhetilformamide. The oxidation of the double bond is carried out in the same way as compound 2n to obtain the compound 2r.

k- The acetilation reaction the compound 2r is carry out in similar way as been said in section a) of the reinvindication Number 2 in order to give place to product 2s.

H 11.05.98

3. Spirostanones obtained according to claims 1 and 2 are characterized because their are used as regulator of vegetal growth.

5 4. Spirostanics analogues of brassinosteroids according to claims from 1 to 3 are characterized because they are utilized as regulators of growth plant and as flowers preservative.

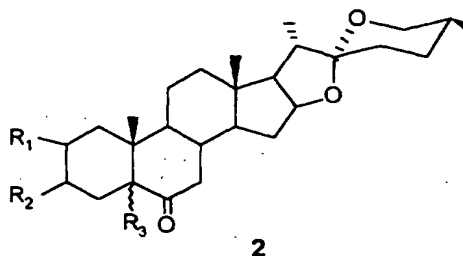
10 5. Formulation that contains spirostanones or spirostanics analogues of brassinosteroids of claims (1 and 4), characterized by being a water form that contains between 10-4- 100 ppm of the active principle and can be applied alone or mixed with herbicides, pesticides, fertilizers, etc, that are soluble in water.

15 6. Use of spirostanones or spirostanics analogues of brassinosteroids of former claims as regulators of growth plant and like flowers preservative.

N 11.05.98

SUMMARY.

This present invention is related with the biological chemical branch, and in particular with the preparation of new spirostanics analogues of brassinosteroids and with oxygenated functions in diferent positions of the A ring starting from sapogenins steroidal, through the performance of dihydroxylation reactions to a Δ^2 -steroid as principal reaction. The preparation of 6-oxo spirobrassinosteroids is described with oxygenated functions in positions 2 and 3 o 3 and 5, with the following general formula (2):



where:

Compounds	R ₁	R ₂	R ₃
2a	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H α
2b	HO β	CH ₃ COO β	H α
2c	CH ₃ COO β	HO β	H α
2d	HO β	HO β	H α
2e	HO β	HO β	H β
2f	CH ₃ COO β	CH ₃ COO β	H β
2g	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H α
2h	CH ₃ COO β	HO α	H α
2i	HO β	HO α	H α

H 11.05.98

2j	HO β	HO α	H β
2k	CH ₃ COO β	CH ₃ COO α	H β
2l	CH ₃ COO α	CH ₃ COO β	H α
2m	HO α	HO β	H α
2n	HO α	HO α	H α
2ñ	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	H α
2o	H	CH ₃ COO β	HO α
2p	H	HO β	HO α
2q	H	HO β	HO β
2r	HO α	HO α	HO α
2s	CH ₃ COO α	CH ₃ COO α	HO α

These synthesized compounds present regulating activity of plant growth in very low concentrations, with wide perspectives for their use in Agriculture.